

# Polímeros acrílicos portadores de grupos naftalensulfónicos con actividad antiangiogénica

---

L. GARCIA<sup>1</sup>, M. M. FERNÁNDEZ<sup>1</sup>, R. M. LOZANO<sup>2</sup>, G. GIMÉNEZ<sup>2</sup>, S. VALVERDE<sup>3</sup>, J. SAN ROMÁN<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros, CSIC

<sup>2</sup>Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC

<sup>3</sup>Instituto de Química Orgánica, CSIC

## Resumen

La inhibición de los promotores de la angiogénesis, como son los factores de crecimiento de fibroblastos, puede ser un nuevo camino para evitar el crecimiento y proliferación de tumores sólidos. El ácido 5-amino-2-naftalensulfónico es un buen inhibidor de los factores de crecimiento de fibroblastos. Esta actividad está basada en la interacción con el sitio de unión de los factores de crecimiento de fibroblastos con la heparina. En este trabajo se ha realizado la incorporación del ácido 5-amino-2-naftalensulfónico a cadenas poliméricas preparadas mediante copolimerización con monómeros ampliamente utilizados en el campo de la biomedicina. También se ha estudiado su capacidad en la inhibición de la mitogénesis dependiente de los factores de crecimiento de fibroblastos «in vitro» obteniéndose buenos resultados. Por tanto, pueden ser un nuevo camino en la lucha contra cánceres y enfermedades que necesiten de estos factores para crecer y desarrollarse.

**Palabras clave:** Ácido 5-amino-2-naftalensulfónico, angiogénesis, factor de crecimiento de fibroblastos, ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico, N-vinilpirrolidona.

## Abstract

Inhibition of angiogenesis-promoting factors such as fibroblast growth factors is considered to be a promising route to inhibit the growth and proliferation for solid tumours. The 5-amino-2-naphthalene sulfonic acid is a good inhibitor of the fibroblast growth factors. Its activity is based on the interaction with the union site of the fibroblast growth factors with the heparin. In this work 5-amine-2-naphthalene sulfonic acid has been incorporated into polymeric chains by radical copolymerization with monomers widely used in biomedicine. Inhibition of fibroblast growth factor mitogenic activity was studied «in vitro» and promising results were obtained. Polymeric drugs that incorporate ANSA in their structure seem good candidates in the development of new therapeutics against some FGF- dependent cancers.

**Keywords:** 5-amino-2-naphthalensulfonic acid, angiogenesis, fibroblast growth factor, 2-acrilamide-2-methylpropanesulfonic acid, N-vinylpyrrolidone.

---

## Correspondencia:

C/ Juan de la Cierva, 3. 28006 Madrid.

- Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros

- Instituto de Química Orgánica

C/ Ramiro de Maetzu, 9. 28040 Madrid.

- Centro de Investigaciones Biológicas

## Introducción

La angiogénesis, o crecimiento de los vasos sanguíneos, es un proceso natural que ocurre en los seres humanos y en el que se encuentran implicados los factores de crecimiento. Numerosas enfermedades han sido relacionadas con alteraciones en estos procesos como son algunos cánceres, la retinopatía diabética, la soriasis... Cuando hay una angiogénesis excesiva los nuevos vasos sanguíneos alimentan los tejidos enfermos y permiten, en el caso del cáncer, que las células tumorales alcancen el torrente sanguíneo y se desplacen a otros órganos produciendo una metástasis tumoral. Una serie de estudios recientes han puesto de manifiesto que la angiogénesis se pone en marcha en las etapas tempranas de la proliferación tumoral. Esto ha convertido a la angiogénesis en un factor de pronóstico privilegiado para una amplia variedad de tumores [1, 2]. La capacidad para inhibir la angiogénesis puede ser también utilizada en el desarrollo de recubrimientos de stents vasculares y material quirúrgico para evitar la vascularización en su uso en medicina.

Dos de los polipéptidos más importantes que estimulan la angiogénesis son los factores de crecimiento de fibroblastos ácido (aFGF) y básico

(bFGF). Por tanto la inhibición de la actividad mitogénica de los factores de crecimiento de fibroblastos se presenta como un objetivo fundamental para el desarrollo de nuevos tratamientos para la inhibición de la angiogénesis [3, 4]. Se ha demostrado que los factores de crecimiento de fibroblastos son muy afines a glicosaminoglicanos sulfatados del tipo de la heparina y del heparan sulfato [5] y su unión a estos compuestos hace que sean biológicamente activos, por lo que cualquier proceso que impida la interacción entre los FGF y la heparina o heparan sulfato constituye un claro objetivo para conseguir la inhibición de la angiogénesis.

La suramina (Figura 1) es una bi-naftil urea polisulfonada que ha sido empleada en el tratamiento de cánceres que no responden a quimioterapia convencional. Esta actividad farmacológica está basada, al menos en parte, en la capacidad de la suramina de impedir que diversos factores de crecimiento sean reconocidos por los receptores correspondientes de la membrana celular [6].

Recientemente se ha descrito una nueva clase de compuestos no citotóxicos con actividad antiangiogénica y antitumoral denominados suradistas (Figura 1) que son derivados

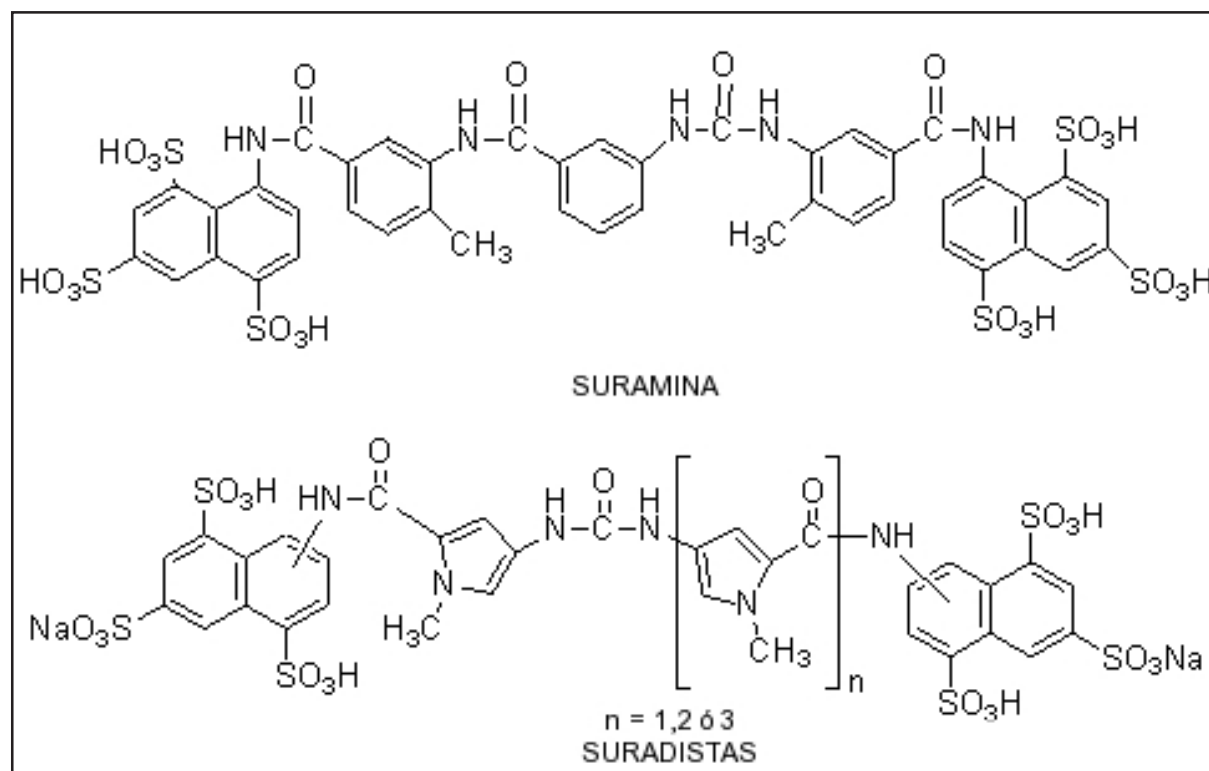


Figura 1. Esquema de las suraminas y suradistas

binaftilsulfonato de la distamicina. Estos compuestos interaccionan fuertemente con los factores de crecimiento de fibroblastos, inhibiendo la unión de éstos a sus receptores de la membrana celular y suprimiendo la actividad angiogénica de estas proteínas [7].

De acuerdo con la estructura molecular de las suradistas, se estudió el ácido 1,3,6-naftalentrissulfónico (NTS) dando resultados positivos «in vivo» e «in vitro» en la inhibición de la angiogénesis inducida por a FGF [8]. También se ha demostrado que derivados del naftaleno con menor número de grupos sulfónicos parecen actuar como mejores inhibidores, sin embargo, esta actividad iba acompañada por la aparición de una clara toxicidad de estos compuestos. De todos los compuestos estudiados los mejores resultados se obtuvieron con el ácido 5-amino-2-naftalensulfónico (ANSA) [9].

El objetivo del presente trabajo es el desarrollo de nuevos sistemas poliméricos biocompatibles que contengan la molécula de ANSA unida a la cadena polimérica principal y el estudio de su capacidad para la inhibición de la mitogénesis dependiente de los FGF.

## Materiales y Métodos

**Reactivos:** *Ácido 5-Amino-2-naftalensulfónico*, 97% (ANSA, Avocado) y *ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico*, 98% (AMPS, Avocado) fueron utilizados directamente, *N-Vinil-2-pirrolidona*, +99% (VP, Aldrich) y *Acrilato de Butilo*, +99% (AB, Aldrich) se purificaron mediante destilación con vacío, *Dioxano* (Panreac) se mantuvo a reflujo sobre

KOH (150 g/l) durante 12 horas y posteriormente se destilo en atmósfera de  $N_2$ , *Dimetilsulfóxido* (Scharlau) fue utilizado directamente, *N,N,N',N'-Tetrametilmetilendiamina* (TEMED, Acros) fue utilizada directamente, *Azobis(isobutironitrilo)* (AIBN, Merk) fue recristalizado dos veces en etanol, *Cloruro de metacrilato*, >98% (Fluka) fue purificado mediante destilación en atmósfera de  $N_2$ .

**Monómero:** Se ha sintetizado un derivado metacrílico del ANSA mediante reacción con cloruro de metacrilato y purificación en columna cromatográfica (M-5-ANSA)

**Polímero:** Se han sintetizado distintos polímeros basados en el ANSA (VP-ANSA y AB-ANSA) y en AMPS (VP-AMPS y AB-AMPS) mediante polimerización radical.

**Caracterización:** Todos los polímeros sintetizados se han caracterizado mediante  $^1H$ -NMR,  $^{13}C$ -NMR, DSC, TGA, GPC, UV, ATR-FTIR y se ha estudiado la liberación del ANSA, toxicidad de los compuestos y su capacidad de inhibición «in vitro» de la mitogénesis dependiente de los FGF.

## Resultados

Se han sintetizado dos familias de copolímeros que incorporan ANSA en su estructura con el fin de obtener dos familias de fármacos poliméricos con diferentes propiedades en medio acuoso. Como monómeros se han utilizado acrilato de butilo, AB (hidrofóbico) y vinilpirrolidona, VP (hidrofílico) que son normalmente utilizados en la formulación de biomateriales debido a su buena biocompatibilidad cuando son polímeros.

Todos los polímeros obtenidos son solubles en agua y presentan pesos moleculares (Tabla 1).

	Composición		GPC		
	Alimentación	Copolímero	$M_w$	$M_n$	$M_w / M_n$
AB-ANSA	30:70	80:20	17002	12182	1.40
AB-ANSA	60:40	82:18	20424	18627	1.59
AB-ANSA	70:30	89:11	40264	18505	2.18
VP-ANSA	40:60	73:27	11118	8539	1.30
VP-ANSA	50:50	85:15	11882	8829	1.35
VP-ANSA	80:20	94:6	27166	22841	1.19

Tabla 1. Resultados de los experimentos de NMR y GPC

Los resultados obtenidos en los ensayos de liberación nos indican que el ANSA no se libera del copolímero, sino que este se fragmenta en fracciones de bajo peso molecular. Mediante ensayos biológicos «in vitro» se han obtenido resultados prometedores en la inhibición de la mitogénesis dependiente de FGF mediante la inhibición de los factores de crecimiento de fibroblastos.

## Discusión

El ácido 5-amino-2-naftalensulfónico es un buen inhibidor de la angiogénesis debido a su interacción con los factores de crecimiento de fibroblastos, lo que impide que se formen nuevos vasos sanguíneos en los alrededores del tumor evitando de esta forma su desarrollo y su proliferación en otras zonas del cuerpo (metástasis).

Los copolímeros sintetizados poseen un peso molecular inferior a 30000 Da, esto los hace adecuados para su uso biológico ya que son fácilmente eliminables mediante vía renal. También han demostrado, mediante ensayos «in vitro», que poseen capacidad para inhibir la mitogénesis celular mediante la inactivación de los aFGF.

## Conclusión

La síntesis de copolímeros que incorporen ANSA en su estructura constituye una vía de investigación prometedora en el desarrollo de nuevas sustancias capaces de inhibir la proliferación celular según los resultados obtenidos «in vitro». Sería interesante obtener copolímeros insolubles en agua para poder estudiar su utilización como recubrimientos que impidan la vascularización.

## Bibliografía

1. **M. Toi et al.** Endothelial growth factors: A target for antiangiogenesis. *The Cancer journal* 8 (6):315-319, 1995.
2. **D. Hanahan et al.** Transgenic mouse models of tumour angiogenesis: The angiogenic switch, its molecular controls, and prospects for preclinical therapeutic models. *European journal of cancer* 32 (14):2386-2393, 1996.
3. **F. Jonca et al.** Cell release of bioactive fibroblast growth factor 2 by exon 6-encoded sequence of vascular endothelial growth factor. *The Journal of biological chemistry* 272 (39):24203-24209, 1997.
4. **D. L. Gorden et al.** Vascular endothelial growth factor is increased in devascularized rat islets of Langerhans in vitro. *Transplantation* 63 (3):436-443, 1997.
5. **A. C. Rapraeger et al.** Requirement of heparan sulfate for bFGF-mediated fibroblast growth and myoblast differentiation. *Science* 252 (5013):1705-1708, 1991.
6. **A. Gagliardi et al.** Inhibition of angiogenesis by suramin. *Cancer research* 52 (18):5073-5075, 1992.
7. **M. Zamaï et al.** Antiangiogenic naphthalene sulfonic distamycin-A derivatives tightly interact with human basic fibroblast growth factor. *Medicinal chemistry research* 7 (1):36-44, 1997.
8. **P. Cuevas et al.** Suppression of acidic fibroblast growth factor-dependent angiogenesis by the antigrowth activity of 1,3,6-naphthalenetrisulfonate. *Neurological research* 21 (2):191-194, 1999.
9. **C. Fernández-Tornero, R. M. Lozano, M. Redondo-Horcajo, Gómez A.M., López J.C., E. Quesada, C. Uriel, S. Valverde, P. Cuevas, A. Romero, and G. Giménez-Gallego.** Leads for development of new naphthalenesulfonate derivatives with enhanced antiangiogenic activity. Crystal structure of acidic fibroblast growth factor in complex with 5-amino-2-naphthalenesulfonate. *The Journal of biological chemistry* 278 (24):21774-21781, 2003.